



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10029947 A**(43) Date of publication of application: **03.02.98**

(51) Int. Cl

A61K 35/78**A61K 35/78****A61K 35/78****C12N 9/99**(21) Application number: **08184835**(22) Date of filing: **15.07.96**(71) Applicant: **NIPPON KOUTAI
KENKYUSHO:KK**(72) Inventor: **NODA KIMITOSHI****(54) REMEDY FOR VIVOTOXIN-TYPE INTESTINAL
CANAL BACTERIAL INFECTION**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a remedy for a vivotoxin-type intestinal canal bacterial infection having an inhibiting effect on ADP ribosyltransferase and a suppressing effect on a diarrheal disease caused by a vivotoxine typical of a cholera toxin by including RG-tannin.

SOLUTION: This remedy for a vivotoxin-type intestinal canal bacterial infection includes RG-tannin obtained from an extract of Rhei Rhizoma and further, preferably, a new quinolone-based and a tetracycline-based antibiotics. The remedy is administrated in a daily dose of 0.01-200mg/kg to an adult in terms of an amount of RG-tannin which is an active ingredient, and the daily dose of the antibiotics as a combination drug is 5-10mg/kg in the case of the new quinolone-based antibiotics and 2-5mg/kg in the case of the tetracycline-based antibiotics. The remedy is

effective for treatment for the intestinal canal bacterial infection by the vivotoxin-type bacteria typical of toxinogenic Escherichia coli, Salmonella, pathogenicity Vibrio (cholera vibrio or enteritis vibrio), Bacillus dysentericus, a bacterium belonging to genus Campylobacter, etc.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-29947

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月3日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78	A E D		A 6 1 K 35/78	A E D E
	A C J			A C J
	A D Z			A D Z
C 1 2 N 9/99			C 1 2 N 9/99	

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平8-184835

(22) 出願日 平成8年(1996) 7月15日

(71) 出願人 000153258

株式会社日本抗体研究所

群馬県高崎市西横手町351番地1

(72) 発明者 野田 公俊

千葉県四街道市美しが丘三丁目6番14号

(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54) 【発明の名称】 生体内毒素型細菌性腸管感染症治療剤

(57) 【要約】

【解決手段】 R G タンニンを有効成分とする A D P - リボシルトランスフェラーゼ阻害剤及び生体内毒素型細菌性腸管感染症治療剤。

【効果】 毒素原性大腸菌、サルモネラ属、病原性ビブリオ菌 (コレラ菌、腸炎ビブリオ)、赤痢菌、カンピロバクター属菌などに代表される生体内毒素型細菌による腸管感染症の治療に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 RGタンニンを有効成分とするADP-リボシルトランスフェラーゼ阻害剤。

【請求項2】 RGタンニンを有効成分とする生体内毒素型細菌性腸管感染症治療剤。

【請求項3】 RGタンニン及び抗生物質を含有する生体内毒素型細菌性腸管感染症治療剤。

【請求項4】 抗生物質がニューキノロン系の抗生物質である請求項3記載の生体内毒素型細菌性腸管感染症治療剤。

【請求項5】 抗生物質がテトラサイクリン系の抗生物質である請求項3記載の生体内毒素型細菌性腸管感染症治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は毒素原性大腸菌、サルモネラ属、病原性ビブリオ菌（コレラ菌、腸炎ビブリオ）、赤痢菌、カンピロバクター属菌などに代表される生体内毒素型細菌による腸管感染症の治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】1990年のWHOの統計によれば、世界中の全死亡者の1/3は感染症によって占められ、その中でも急性呼吸器感染症、下痢症、結核の死亡者が最も多く、この3疾患で年間死亡者数が1000万人に達していると言われている。近年の国際交通の増加と高速化により、人々の各国間の往来は益々頻繁になってきている。それに伴って問題になるのは、人の移動と共に広がる重大感染疾患の拡散である。特に発生頻度の高い、旅行者下痢症と呼ばれる腸管感染症には、毒素原性大腸菌、サルモネラ属、病原性ビブリオ菌（コレラ菌、腸炎ビブリオ）、赤痢菌、カンピロバクター属菌などの菌による感染性疾患が挙げられる。

【0003】上記細菌性疾患の1つであるコレラは、*Vibrio cholerae*のO抗原の違いによって180種類にも及ぶ血清型に分けられており、このうちのO1血清型によって起こる疾患であると考えられていた。O1以外の血清型菌は、まとめてnon-O1と通称されており、典型的なコレラの流行を起こした報告はなかった。ところが、1992年10月インド南部のマドラスにおいて、*Vibrio cholerae* non-O1によるコレラの大流行が発生し、この流行は瞬く間にベンガル湾沿いにカルカッタへも波及した。同年12月-翌年1月にかけて、隣国のバングラデシュにおいても、同種のnon-O1コレラ菌によるコレラの大流行が起こった。当時*Vibrio cholerae*の血清型は138種類報告されていたが、これらの流行株は同一の血清型に属するものの、138種類のどれにも属さないことが明らかとなり、O139と分類された。またベンガル湾沿いに流行が拡大したことから、Bengalという通称名が与えられた。

【0004】*Vibrio cholerae* O139 Bengal (O1

39ベンガル型コレラ菌)によるコレラ流行は、わずか半年余りでインド全土に広がり、カルカッタの市立伝染病院の入院患者からは、一時期*Vibrio cholerae* O1がまったく分離できなくなった。遺伝子解析などの成績から、O139型菌はO1エルトル菌から由来したものであることはわかったものの、O139血清型に特異的な抗原の合成を担っている遺伝子がどこに由来しているのかはまだわかっていない(Mebio, 13(7), 19-23(1996))。

10 【0005】コレラは、コレラ菌の感染によって生じる激しい水様性の下痢を主体とする非常に死亡率の高い疾患である。この水様性下痢の発生機構は次のように考えられている。

【0006】(1)経口摂取されたコレラ菌が小腸粘膜に付着・定着する。

(2)CT(コレラトキシン)を産生する。

(3)CTが腸管上皮細胞のアデニレートサイクラーゼを活性化する。

(4)cAMPを上昇させる。

20 (5)cAMP依存性のCl-チャネル(CFTR)を介してコレラの主症状である水様性下痢を引き起こす。

【0007】上記(3)のステップは、より詳細には、コレラトキシンがG蛋白質をADPリボシル化し、その下流にある情報伝達を阻害することにより、アデニレートサイクラーゼを活性化するものといわれている(病態生理, 14(3), 181-186(1995), 飯田哲也, 余明順, 本田武司)。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】このように、コレラ菌に代表される腸管感染症原因菌が産生する毒素の活性を阻害し、無毒化することができれば、これらの感染症の根本的治療は可能になると考えられ、その出現が望まれている。従って、本発明の目的は腸管感染症原因菌が産生する毒素による生体内反応を阻害し、当該感染症を治療するための医薬を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記実情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、大黄、桂皮、黄连、麻黄又はこれらの抽出物がコレラトキシンの活性を阻害・抑制することを見出し、先に特許出願した(WO94/03193)。その後、より安全で有効性が高く、かつ医薬としての使用性を容易ならしめるために、上記生薬中の有効成分を精製分離することを試みた。その結果、大黄抽出物中のRGタンニンに極めて強いADP-リボシルトランスフェラーゼ阻害作用及びコレラトキシンに代表される腸管感染症が産生する毒素による下痢治療作用を見出し、またRGタンニンと抗生物質とを併用すれば更に当該治療効果が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

50 【0010】すなわち、本発明はRGタンニンを有効成

分とするADP-リボシルトランスフェラーゼ阻害剤を提供するものである。また、本発明は、RGタンニンを含む有効成分とする生体内毒素型細菌性腸管感染症治療剤を提供するものである。更に、本発明は、RGタンニン及び抗生物質を含む生体内毒素型細菌性腸管感染症治療剤を提供するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明に用いられるRGタンニンは、自体公知の化合物であり、その薬理作用については抗精神作用、抗攻撃作用、鎮痛作用、抗メタンフェタミン作用、抗ノルアドレナリン作用、抗ドーパミン作用等 (Jpn. J. Pharmacol., 46 (Suppl.), 173P (1988); Eur. J. Pharmacol., 183 (4), 1439-1440 (1990)) が報告されているが、ADP-リボシルトランスフェラーゼ阻害作用及び上記腸管感染症に対する作用については全く知られていない。

【0012】RGタンニンは、例えば大黃の抽出物から分離精製することができる。分離手段としては、大黃の熱水抽出物をゲル濾過用カラム、イオン交換樹脂カラム等に付すことにより行うのが好ましい。

【0013】より詳細な分離法は、次の通りである。すなわち、大黃エキスを粉末を水に溶解し、セファデックスLH-20カラムに注入し、水で洗浄後、50%エタノール、100%エタノール、次いで100%メタノール、最後に、50%アセトンで溶出を行う。ここで、水で溶出されるのは多糖、センノシド、カテキン、ガリクアシッドであり、50%エタノールでは低分子タンニン、アントラキノン、アントラキノングルコシドである。100%エタノールではリンドレイン；100%メタノールでは、RGタンニン；50%アセトンでラタンニンが溶出される。この100%メタノール抽出画分 (RGタンニン画分) を集め、水に溶解後、これをMC I GEL CHP-20Pカラムに負荷し、水/メタノールの比率を10:0から7:3の濃度勾配で溶出、次いで7:3から4:6の濃度勾配で溶出後、水/メタノールの比率を4:6から0:100にまで濃度を上げて溶出する。最後の4:6から0:100の溶出画分を集め、精製RGタンニンを得る。これを必要に応じて濃縮、凍結乾燥して用いる。

【0014】上記の大黃抽出物中の数多くの画分のうち、抗コレラトキシン作用は、RGタンニンに特異的である。

【0015】なお、ラットにRGタンニンを1日7.5 mg/kgと15 mg/kg投与したところ、血清中の尿素態窒素、クレアチニン、メチルグアニジン等の変化は認められなかったが、コハク酸グアニジンが有意に減少したと報告されている (Nephrom, 58 (2), 155-160, 1991)。

【0016】RGタンニンは、後記実施例に示すように、優れたADP-リボシルトランスフェラーゼ阻害作用及びコレラトキシンに代表される生体内毒素による下

痢抑制作用を有することから、細菌性腸管感染症治療剤として有用である。

【0017】また、RGタンニンに各種抗生物質を併用することにより細菌性腸管感染症に対する治療効果は更に増強される。ここでRGタンニンと併用できる抗生物質としては、例えばナフロキサシン、エノキサシン、オフロキサシン、シプロキサシン、ロメフロキサシン、トスフロキサシン、スパフロキサシン、レボフロキサシン等のニューキノロン系抗生物質；例えばテトラサイクリン、テトラサイクリンヒドロクロライド、テトラサイクリンメタホスファイト、オキシテトラサイクリンヒドロクロライド等のテトラサイクリン系抗生物質が例示できる。

【0018】本発明の治療剤は、RGタンニン単独又はRGタンニンと抗生物質との両者をそのまま、あるいはこれらを医薬として許容される担体と組合わせて各種の投与形態に適した製剤とすることができる。投与形態としては、特に限定がなく、必要に応じて適宜選択して使用され、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エリキシル剤等の経口剤；注射剤、坐剤等の非経口剤が挙げられる。

【0019】医薬として許容される担体としては、例えばスクロース、デンプン、マンニト、ソルビット、ラクトース、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤；例えばセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、スクロース、デンプン、デキストリン、マクロゴール等の結合剤；例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤；例えばステアリン酸マグネシウム、蔗糖脂肪酸エステル、水素添加植物油、エアロシル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリエチレングリコール等の滑沢剤；例えばクエン酸、メントール、グリシン、オレンジ末等の矯味剤；例えば安息香酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤；例えばクエン酸クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定化剤；例えばメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤；例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース等の分散剤；矯臭剤；着色剤；例えば水等の希釈剤等の製剤化に慣用の有機又は無機の各種担体が挙げられる。

【0020】本発明の治療薬の投与量は、症状の度合、患者の全身状態、年齢、体重等に応じて十分な治療効果を発揮し得る量であり、剤型等を考慮して適宜決定されるものであるが、有効成分であるRGタンニンの量としては、通常成人において1日当たり0.01~200mg

／kg／日であり、好ましくは0.1～20mg／kg／日である。また、配合剤としての抗生物質の投与量は通常用いられている投与量を用いる。すなわち、ニューキノロン系抗生物質の場合は5～10mg／kg／日であり、テトラサイクリン系の場合は2～5mg／kg／日の割合になるように配合する。

【0021】

【実施例】以下、実施例を挙げて、本発明を更に詳細に説明するが、本発明は下記実施例によって何ら限定されるものではない。

【0022】参考例1

(1) 大黃24gに240gの精製水を加え、100℃で1時間加熱抽出した。得られた抽出液を濾過後、スプレードライして8.6gの乾燥エキスパウダーを得た。

(2) 大黃エキスパウダーを水に溶解し、セファデックスLH-20カラムに注入し、水で洗浄後、50%エタノール、100%エタノール、次いで100%メタノール、最後に、50%アセトンで溶出を行った。100%メタノールで溶出される画分を集め、凍結乾燥後、再度水に溶解した。

(3) この100%メタノール抽出画分(RGタンニン画分)を集め、水に溶解後、これをMC1 GEL CHP-20Pカラムに負荷し、水／メタノールの比率を10:0から7:3の濃度勾配で溶出、次いで7:3から4:6の濃度勾配で溶出後、水／メタノールの比率を4:6から0:100にまで濃度を上げて溶出した。最後の4:6から0:100の溶出画分を集め、精製RGタンニンを得た。これを濃縮、凍結乾燥し、以下の実験に供した。

【0023】実施例1 (ADP-リボシルトランスフェラーゼ阻害作用)

(1) G蛋白質のADP-リボシル化の測定: コレラトキシン(CT)は細胞内のG蛋白質の1つであるGsαをADP-リボシル化することが、その主な作用であることが知られている。そこで、RGタンニンがこのG蛋白質のADP-リボシル化を抑制するかどうかを大腸癌由来のCaco-2細胞の膜分画を用いて検討した。

【0024】CTによるG蛋白質のADP-リボシル化反応は、盛永らの報告した方法(Morinaga, N., Noda, M. and Kato, I., FEBS Letters, 271, 211(1990))で行った。ヒト大腸癌由来のCaco-2細胞の膜分画を超遠心分離により調製した。1μM [α-³²P] NAD (2μCi)、10mM チミジン、1mM EDTA、5mMジチオスレイトール(DTT)及び50mMのリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)の反応液に膜分画100μgとコレラトキシンA(CTA)2.5μg更にRGタンニンを加えて37℃、1時間反応させた。これをトリクロ酢酸で沈澱させた後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。ゲルの放射活性は、BIO-イメージングアナライザーで測定した。

【0025】この結果、膜分画にCTAを加えると、GsαのADP-リボシル化が起こり、³²Pの取り込みが観察されるが、これにRGタンニンを加えると濃度依存的に抑制された(図1)。更に、CTAを加えずRGタンニンだけを加えた群をみると内在性のADP-リボシル化にはRGタンニンはほとんど影響を与えないことが確認された。このことはRGタンニンのCTに対する特異性を示している。

【0026】(2) アグマチンアッセイ法: CTの基質であるNADとアグマチン(Agmatine)との親和性についてラインウィーバー・バーク(Lineweaver-Burk)のプロットを用いて検討した。

【0027】アグマチンアッセイ法は野田等の報告した方法(Noda, M. et al., Biochemistry, 28, 7636(1989))を用いて行った。50mMのリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)、5mM MgCl₂、100μM GTP、100μM [アデニン-¹⁴C] NAD (6000cpm)、20mM DTT、20mM アグマチン及びオボアルブミン(0.1mg/ml)の反応液に1μgのCTA及び被検試料を混合し(合計量300μl)、30℃で3時間作用させた。この反応液から50μl採取し、0.5cm×2cmのカラムに集めたダウエクソAG 1-X2(Bio Rad社製)に通して未反応の[アデニン-¹⁴C] NADを除き、形成される[アデニン-¹⁴C] ADPリボシル化アグマチンを測定した。この[アデニン-¹⁴C] ADPリボシル化アグマチンの形成を指標に、被検試料によるCTのADP-リボシル化転移酵素活性の阻害率を求めた。

【0028】この結果、RGタンニンはNADとCTの親和性には影響を与えないが、アグマチンとの親和性を著しく低下させていることが明らかとなった(図2)。この事実からRGタンニンがNADの結合部位に何ら影響を与えず、アグマチンあるいはGsαとの結合を抑制していることが示された。更に、グラフが直線性を示すことから、RGタンニンがCTの特定の部位を修飾することが示された。

【0029】実施例2 (マウス結紮腸管ループ法を用いた抗CT活性)

マウス結紮腸管ループ法は、Yamamotoらの方法(Yamamoto, K. et al., 1979, Appl. Environment. Microbiol., 37:181-186)に従って行った。

【0030】この結果、図3に示すように100ngのCTで起きた液体貯留は1μgのRGタンニンによって完全に抑制された。これに対し、大黃は50μg以上で、大黃の成分であるセンニダインAは40μg以上で、またエピガロカテキンガレートは100μg以上ではじめて完全に抑制した。このことから、RGタンニンの抗CT活性は大黃の50倍であり、また大黃由来の他の成分の50～100倍以上であった。

【0031】実施例3 (ウサギ結紮腸管ループ法を用い

た抗CT活性)

ウサギ結紮腸管ループ法は、Gorbach S.L.等の報告した方法 (Gorbach, S. L., et al., J. Clin. Invest., 50, 881 (1971)で行った。体重2kgの雄のウサギ (日本白色種) を用いて、48時間絶食後、ウサギをチオペンタールナトリウムにて麻酔する。開腹後、10~12cmのループを作り、それぞれ2mlのCT (250ng/2ml=125ng/ml) CTと被検試料の混合液及びPBS

(一) を注入してから腹壁を縫合した。24時間後、チオペンタールナトリウムにて麻酔死させ、再び開腹し、 * 10

コーンスターチ	63mg
結晶セルロース	10mg
カルボキシメチルセルロースカルシウム	7mg
軽質無水ケイ酸	10mg
ステアリン酸マグネシウム	10mg
RGタンニン	200mg

上記配合割合で均一に混合し、打錠機にて圧縮成型して1錠300mgの錠剤を調製する。 ※

乳糖	50mg
結晶セルロース	40mg
ステアリン酸マグネシウム	10mg
RGタンニン	200mg

上記の割合で均一に混合し、1カプセル当たり300mgのカプセル剤を調製した。 ★

RGタンニン	100mg
ノルホキサシン	100mg
デンプン	300mg
乳糖	240mg
結晶性セルロース	400mg
ポリビニルアルコール	60mg

【0036】上記配合剤10重量部に対して蒸留水30重量部を加えて均一に混合した後、破碎造粒して乾燥し、次いで篩別して直径1410-177μmの大きさ ☆

RGタンニン	100mg
テトラサイクリン	200mg
デンプン	200mg
乳糖	240mg
結晶性セルロース	400mg
ポリビニルアルコール	60mg

【0038】上記配合剤10重量部に対して蒸留水30重量部を加えて均一に混合した後、破碎造粒して乾燥し、次いで篩別して直径1410-177μmの大きさの顆粒剤とした。

【0039】

【発明の効果】RGタンニンはADP-リボシルトランスフェラーゼを阻害し、生体内毒素によって生じる下痢症状の抑制効果が強いので、毒素原性大腸菌、サルモネラ属、病原性ビブリオ菌 (コレラ菌、腸炎ビブリオ)、赤痢菌、カンピロバクター属菌などに代表される生体内毒素型細菌による腸管感染症の治療に有効である。 ◆ 50

* ループを摘出した (24時間放置している間は餌を与えず、水は自由摂取させた)。摘出したループの長さを測り、中に貯留している液体をピーカーに入れ、重量を測定した。

【0032】この結果、250ngのCTで起きた液体貯留は3μgのRGタンニンによって完全に抑制されることが明らかとなり (図4)、マウスのような小動物だけでなくウサギのような動物においてもCTの作用を抑制することから、臨床における有効性が期待できる。

【0033】製剤例1

63mg
10mg
7mg
10mg
10mg
200mg

※【0034】製剤例2

50mg
40mg
10mg
200mg

★【0035】製剤例3

100mg
100mg
300mg
240mg
400mg
60mg

☆の顆粒剤とした。

【0037】製剤例4

100mg
200mg
200mg
240mg
400mg
60mg

◆【図面の簡単な説明】

【図1】Caco-2細胞の膜分画におけるコレラトキシン (CT) によるADP-リボシル化に対するRGタンニンの作用を示す電気泳動の結果の写真である。

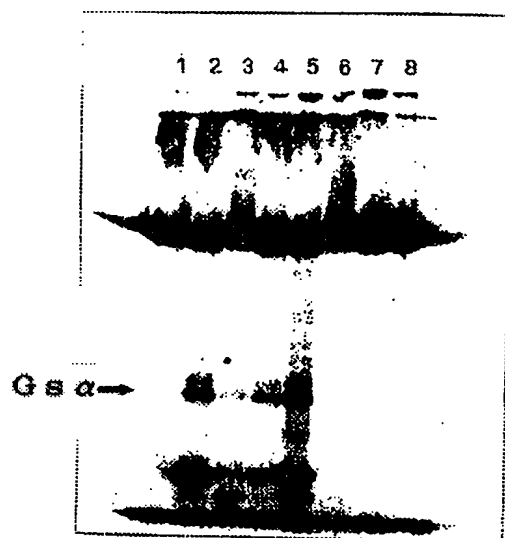
【図2】コレラトキシンA (CTA) サブユニットのNAD-アグマチンADPリボシルトランスフェラーゼ活性に対するRGタンニンの作用を示す図である。

【図3】マウス腸管におけるコレラトキシン (CT) による体液貯留に対する大黄及びその成分の作用を示す図である。

【図4】ウサギ腸管におけるコレラトキシン (CT) に

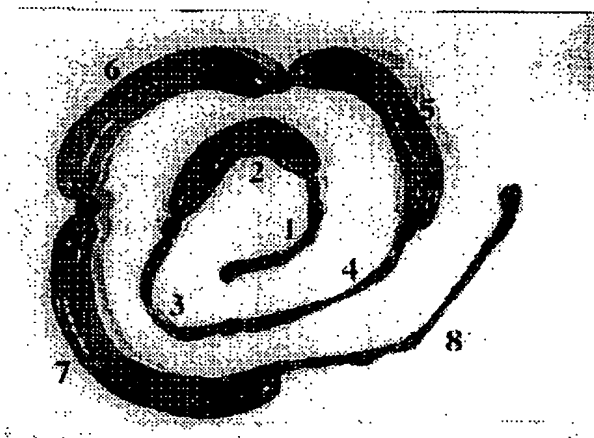
よる体液貯留に対するRGタンニンの作用を示す生物の * * 形態 (腸管) の写真である。

【図1】



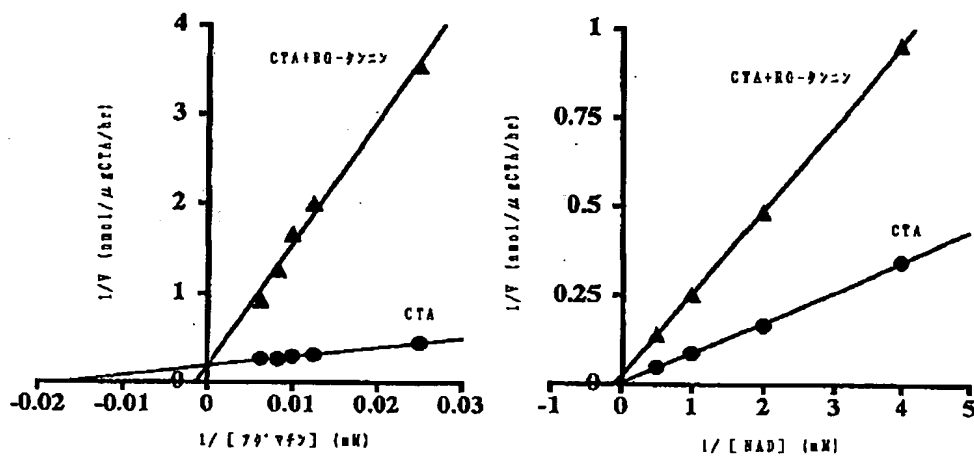
1. コントロール
2. CTA ($2.5 \mu\text{g}$)
3. CTA + RG-タンニン ($15 \mu\text{g}$)
4. CTA + RG-タンニン ($10 \mu\text{g}$)
5. CTA + RG-タンニン ($5 \mu\text{g}$)
6. RG-タンニン ($15 \mu\text{g}$)
7. RG-タンニン ($10 \mu\text{g}$)
8. RG-タンニン ($5 \mu\text{g}$)

【図4】



1. 腸管液
2. CT 250ng
3. CT 250ng + RG-タンニン $10 \mu\text{g}$
4. CT 250ng + RG-タンニン $3 \mu\text{g}$
5. CT 250ng + RG-タンニン $1 \mu\text{g}$
6. CT 250ng + RG-タンニン 300ng
7. CT 250ng + RG-タンニン 100ng
8. RG-タンニン $10 \mu\text{g}$

【図2】



【図3】

